

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

20.09.99	
REC'D	05 NOV 1999
WIPO	PCT

JP 99/5120

EV

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 9月18日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第265126号

出 願 人

Applicant(s):

科学技術振興事業団

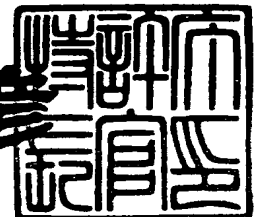
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3071728

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA907368

【提出日】 平成10年 9月18日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C07K
C12N

【発明の名称】 脳型有機アニオントランスポーターとその遺伝子

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市由野台1-23-7

【氏名】 遠藤 仁

【発明者】

【住所又は居所】 東京都立川市栄町1-10-47

【氏名】 関根 孝司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区千駄木5-49-17-102

【氏名】 楠原 洋之

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

特平 1 0 - 2 6 5 1 2 6

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

特平 10-265126

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脳型有機アニオントランスポーターとその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脳型有機アニオントランスポーターOAT3。

【請求項2】 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸配列が欠失し、他のアミノ酸で置換若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列を有する請求項1に記載の脳型有機アニオントランスポーターOAT3。

【請求項3】 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸配列が欠失し、他のアミノ酸で置換若しくは付加されていてもよいアミノ酸配列をコードする核酸。

【請求項4】 配列表の配列番号1で示される塩基配列を有するDNAである請求項3に記載の核酸。

【請求項5】 配列表の配列番号1で示される塩基配列を有するDNAの連続する少なくとも14塩基又はその相補鎖からなる核酸。

【請求項6】 塩基の数が20以上である請求項5に記載の核酸。

【請求項7】 請求項1又は2に記載の脳型有機アニオントランスポーターOAT3を認識し得る抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は有機陰イオン（有機アニオン）輸送に関与する遺伝子と、その遺伝子がコードするポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

肝臓および腎臓は、生体異物や薬物の代謝および体外排出に関して重要な役割を果たしている。尿細管細胞および肝細胞は極性を有する上皮細胞でありアニオン性の物質の一部は、輸送担体（トランスポーター）により側底膜を介して腎臓および肝臓中に取り込まれ、また細胞内で代謝により産生された有機アニオンも

トランスポーターにより排出されることが推測される。

【0003】

尿細管細胞や肝細胞の側底膜を介した有機アニオンの取り込みについては、これまで摘出臓器灌流法や単離細胞膜小胞系などを用いた実験系により研究されてきた。

【0004】

しかし従来の手法では、側底膜を介した有機アニオン輸送について詳細に解析することは困難であり、トランスポーターそのものを単離して詳細に解析することが望まれてきた。

【0005】

一方、脳においても有機アニオン輸送がおこなわれていることも複数の実験結果から推測されている。脳における有機アニオン輸送は、主に内因性および外来性の有機アニオンの脳外への排泄に働いているものと考えられる。

【0006】

脳における有機アニオン輸送は、内因性アニオンおよび外来性異物の脳からの排除という重要な役割を担っていると予想されているにも関わらず、生理的実験が困難なことから、腎臓や肝臓以上にその輸送の詳細は不明である。

【0007】

これらの背景をふまえ、有機アニオントランスポーターの分子実体の探索が1990年代に入り積極的に行われた。この結果、肝臓の側底膜の有機アニオントランスポーターが昨年までに二つ単離された。(Hagenbuch, B.らProc Natl Acad Sci USA 88巻、10629-33頁、1991年、Jacquemin, E.ら、Proc Natl Acad Sci USA、91巻、133-7頁、1994年)。

【0008】

昨年、我々は独自に、腎臓での有機アニオン輸送において最も重要な役割を果たしている有機アニオントランスポーターOAT1の単離に成功し(Sekine, T.ら、J Biol Chem 272巻、18526-9頁、1997)、既に特許出願済みである。OAT1は化学構造の異なる多くの有機アニオンを輸送することの出来るトランスポーターであり、種々のアニオン性薬物の輸送も行っている。

特平10-265126

【0009】

OAT1の発現は腎特異的で、腎以外では脳に極めてわずかな発現をみるのみである。

【0010】

最近我々はさらに、OAT1とアミノ酸レベルで40%台の弱い相同性を持つ肝特異的有機アニオントランスポーター（OAT2）を同定した（FEBS letter 429巻、179-182頁、1998年）（特願平10-169174号）。

【0011】

OAT1およびOAT2の単離、同定は有機アニオントランスポーターがファミリーを形成することを示している。さらにOAT2が肝特異的に発現していることから、このファミリーが腎特異的ではなく、種々の臓器にも発現していることも示唆する。

【0012】

既に述べたように脳には有機アニオン輸送系が存在するものと考えられるが、脳でのOAT1の発現は極めてわずかであり、又、OAT2は存在しない。我々は、これらの事実から脳における有機アニオン輸送を担う未知のトランスポーターの存在を予想した。

【0013】

他方、肝臓の側底膜における有機アニオン輸送は複雑であり、特に肝細胞内で多量に産生される抱合体（その多くは有機アニオン）の血中への流出経路は未だ不明である。この肝臓での有機アニオン輸送についても、OAT2を含む上記有機アニオントランスポーターのみでは説明しきれず、さらなる未知のトランスポーターの存在が予想される

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、脳および肝臓における有機アニオン輸送に関与する新規な有機アニオントランスポーター遺伝子およびその遺伝子がコードするポリペプチドである有機アニオントランスポーターを同定し、提供することにある。その他の目的については以下の記載より明白である。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、腎臓での有機アニオン輸送において最も重要な役割を果たしている有機アニオントランスポーターOAT1を単離した (Sekine, T.ら、J Biol Chem 272巻, 18526-9頁、1997)。さらにOAT1との構造上の類似性から、肝特異的な有機アニオントランスポーター (OAT2) を同定した (Sekine, T.ら、FEBS letter 429巻、179-182頁、1998年)。さらにOAT1およびOAT2が、有機カチオントランスポーターOCT1 (Grundemann, D.ら、Nature, 372巻, 549-52頁、1994) と弱い相同性があることを既に報告している (Sekine, T.ら、J Biol Chem 272巻, 18526-9頁、1997)。

【0016】

これらの事実をふまえ、OAT1、OAT2、OCT1に共通する配列を同定し、さらにその配列からデジェネレートプライマー (degenerate primer) を作成した。このデジェネレートプライマー (degenerate primer) を用い、ラット脳mRNAからRT (reverse transcript) -PCR (polymerase chain reaction) 法によって、OAT1、OAT2、OCT1と弱い相同性を有する新規cDNA断片を同定した。このcDNA断片を用いて、ラットcDNAライブラリーよりこれまでに報告のないcDNAを同定し、この蛋白質をOATファミリーの第三のメンバーとして脳型有機アニオントランスポーターOAT3 (Organic Anion Transporter 3) と命名した。

【0017】

本発明の有機アニオントランスポーターOAT3は、異なる化学構造を持った有機アニオンに対してこれらを輸送する (取り込む能力を有する)、広い範囲の基質選択性を有するトランスポーターである。

【0018】

本発明のタンパク質としては、配列番号2で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば、配列番号2で示されたアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、有機アニオン輸送活性が失われな

特平10-265126

い程度であればよく、通常1～約110個、好ましくは1～約55個である。このようなタンパク質は、配列番号2で示されたアミノ酸配列と通常、60～80%、好ましくは70～90%のアミノ酸配列のホモロジーを有する。

【0019】

本発明において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、通常、ハイブリダイゼーションを、 $5\times\text{SSC}$ 又はこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、 $37\sim 42^{\circ}\text{C}$ の温度条件下、約12時間行い、 $5\times\text{SSC}$ またはこれと同等の塩濃度の溶液等で予備洗浄を行った後に、 $1\times\text{SSC}$ 又はこれと同等の塩濃度で洗浄を行うことにより実施できる。また、より高いストリンジェンシーを得るためには、洗浄を $0.1\times\text{SSC}$ 又はこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。

【0020】

本発明の有機アニオントランスポーター遺伝子は、適当な哺乳動物の腎臓、脳などの臓器の組織や細胞を遺伝子源として用いてスクリーニングを行うことにより単離取得できる。哺乳動物としては、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、ブタ、ウサギ、ラット、マウスなどの非ヒト動物のほか、ヒトが挙げられる。

【0021】

遺伝子のスクリーニングおよび単離は、ホモロジースクリーニングおよびPCRスクリーニングなどにより好適に実施できる。

【0022】

得られたcDNAについては、常法により塩基配列を決定し、翻訳領域を解析して、これにコードされるタンパク質、即ちOAT3のアミノ酸配列を決定することができる。

【0023】

得られたcDNAが有機アニオントランスポーター遺伝子のcDNAであること、即ちcDNAにコードされた遺伝子産物が有機アニオントランスポーターであることは、例えば次のようにして検証することができる。即ち、得られたOAT3遺伝子から調製したcRNAを卵母細胞に導入して発現させ、有機アニオンを細胞内に輸送する（取り込む）能力を、適当な有機アニオンを基質とする通常

の取り込み実験 (Sekine, T.ら、J Biol Chem 272巻、18526-9頁、1997) により、細胞内への基質取り込みを測定することにより確認できる。

【0024】

また、発現細胞に同様の取り込み実験を応用して、OAT3の輸送特性や基質特異性などを調べることができる。

【0025】

得られたOAT3遺伝子のcDNAを用いて、異なる遺伝子源で作製された適当なcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる組織、異なる生物由来の相同遺伝子や染色体遺伝子等を単離することができる。

【0026】

また、開示された本発明の遺伝子の塩基配列 (配列番号1) に示された塩基配列、もしくはその一部の情報に基づいて設計された合成プライマーを用い、通常のPCR法によりcDNAライブラリーから遺伝子を単離することが出来る。

【0027】

cDNAライブラリー及びゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは例えば、「Molecular Cloning; Sambrook, J., Fritsh, E.F.およびManiatis, T.著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊」に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合にはこれを用いてもよい。

【0028】

本発明の有機アニオントランスポーター (OAT3) は、例えば、有機アニオントランスポーターをコードするcDNAを用い、遺伝子組み換え技術により生産することができる。例えば、有機アニオントランスポーターをコードするDNA (cDNA等) を適当な発現ベクターに組み込み、得られた組み換えDNAを適当な宿主細胞に導入することができる。ポリペプチドを生産するための発現系 (宿主ベクター系) としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系等が挙げられる。このうち、機能タンパクを得るためには、昆虫細胞および哺乳動物細胞を用いることが望ましい。

【0029】

例えば、ポリペプチドを哺乳動物で発現させる場合には、有機アニオントランスポーターをコードするDNAを、適当な発現ベクター（例えば、レトロウイルス系ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等）中の適当なプロモーター（例えばSV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1 α プロモーター等）の下流に挿入して発現ベクターを構築する。次に、得られた発現ベクターで適当な動物細胞を形質転換して、形質転換体を適当な培地で培養することによって、目的とするポリペプチドが生産される。宿主とする哺乳動物細胞としては、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞または、腎臓組織由来の初代培養細胞やブタ腎由来LLC-PK1細胞、フクロネズミ腎由来OK細胞等の細胞株が挙げられる。

【0030】

有機アニオントランスポーターOAT3をコードするcDNAとしては、例えば、配列1に示される塩基配列を有するcDNAを用いることが出来るほか、前記のcDNAに限定されることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAを用いることもできる。この場合、一つのアミノ酸をコードするコドンは各々1～6種類知られており、用いるコドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列をもつDNAはDNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用して部位変異導入法（site specific mutagenesis）「Mark, D.F. ら、Proc Natl Acad Sci USA 第18巻、5662-5666頁、1984年」等により実施できる。

【0031】

本発明の有機アニオントランスポーター遺伝子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド（オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド）は、有機アニオントランスポーター遺伝子を検出するためのプローブとして

使用できるほか、有機アニオントランスポーターの発現を変調させるために、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、やりボザイム、デコイとして使用することもできる。このようなヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1で示される塩基配列の中の通常、連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチドを用いることができ、ハイブリダイズをより特異的とするためには、部分配列としてより長い配列、例えば20塩基以上あるいは30塩基以上の配列を用いても良い。

【0032】

また、本発明の有機アニオントランスポーターまたは、これと免疫学的同等性を有するポリペプチドを用いて、その抗体を取得することが出来、抗体は、有機アニオントランスポーター検出や精製などに利用できる。抗体は、本発明の有機アニオントランスポーター、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を抗原として用いて製造できる。ポリクロナール抗体は、宿主動物（たとえば、ラットやウサギ）に抗原を接種し、免疫血清を回収する通常の方法により製造することができ、モノクロナール抗体は、通常のハイブリドーマ法などの技術により製造できる。

【0033】

【実施例】

以下、実施例をもって本説明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【0034】

なお下記実施例において、各操作は特に断りがない限り、「Molecular Cloning: Sambrook, J., Fritsh, E.F.およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊」に記載の方法により行うか、または、市販のキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0035】

実施例 1

多選択性有機アニオントランスポーター3 (OAT3) cDNAの単離とその解析

(1) OAT1、OAT2、OCT1の塩基配列情報を基にしたデジェネレートプライマー (degenerate primer) の作成

既に我々が単離したOAT1、OAT2、および報告されているOCT1の塩基配列情報から、これら3つのトランスポーター間で共通するアミノ酸配列(OAT1のアミノ酸配列の267-275および447-452に相当部分)より、デジェネレートプライマー (degenerate primer) を作成した。

【0036】

ラット脳よりGITC法により全RNAを抽出し、さらにオリゴdT (oligo dT) カラムを用いてポリ(A)+RNAを精製した。このラット脳ポリ(A)+RNAより逆転写酵素 (reverse transcriptase) を用いてcDNAを作成し、これを鋳型として上記デジェネレートプライマー (degenerate primer) によりPCRを行った。この結果、約550bpのPCR産物が得られた。

【0037】

このPCR産物を、TAクローニングキット (インヴィトロゲン社製) を用いてクローン化し、そのいくつかの塩基配列を決定したところ、OAT1とアミノ酸レベルで50%台の相同性を有する新規cDNA (B10) が得られた。

【0038】

B10 cDNAを³²Pでラベルしたプローブを用いて、ラットの種々の臓器より抽出したポリ(A)+RNAによるノーザンハイブリダイゼーション (Northern hybridization) をおこなったところ、肝臓、腎臓、脳および目に陽性のバンドを検出した。

【0039】

既に我々は、ラット腎の良好なcDNAライブラリーを持っていたため、このラット腎cDNAライブラリーをB10プローブ用いてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、37℃のハイブリダイゼーション用溶液中で一昼夜行い、その後フィルター膜は、37℃で0.1×SSC/0.1%SDSで洗浄した。ハイブリダイゼーション溶液としては、50%ホルムアミド、5×標準クエン酸NaCl溶液 (standard saline citrate(SSC))、3×デンハード液、0.2%SDS、10%硫酸デキストラン、0.2mg/ml変性サーモン精子D

NA、2.5 mMピロリン酸ナトリウム、25 mM MES、0.01% Antifoam B (シグマ社製)を含むpH6.5の緩衝液を用いた。 λ ZipLox中に単離されたクローンは、*in vivo excision*法によりプラスミドベクターpZLにさらにサブクローン化した。この結果、有機アニオン輸送活性を持つ新規クローン (rk1411) が得られた (輸送機能解析については以下の実施例2参照)。

【0040】

上記により得られたクローン (rk1411) の塩基配列の決定は以下のように行なった。まず、キョーエンス用デリーションキット (タカラ社製) を用いて、rk1411を片側より約300bpずつ削除した複数のプラスミドDNAを得た。これらを自動シーケンサー (アプライドバイオシステム社製) を用いてその塩基配列を解析した。さらにrk1411に対する特異的オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、自動シーケンサーを用いて逆方向からもその塩基配列を解析し、最終的にrk1411の全塩基配列を決定した (配列番号1に記載)。

【0041】

実施例2 (rk1411の機能の特定)

(1) 上記により得られたクローン (rk1411) を含むプラスミドから、T7 RNAポリメラーゼを用いて、インビトロでcRNA (cDNAに相補的なRNA) を調製した (Sekine, T., et al. J Biol Chem 272巻、18526-9頁、1997年参照)。

【0042】

得られたcRNAを、既に報告されている方法に従い (Sekine, T., et al. J Biol Chem 272巻、18526-9頁、1997年)、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、この卵母細胞について放射能標識された種々の有機アニオンおよび有機カチオンによる取り込み実験を行なった。この結果、図1に示すようにrk1411を発現させた卵母細胞は ^{14}C -PAH (パラアミノ馬尿酸)、 ^3H -オクラトキシンA、 ^3H -エストロンサルフェートの取り込みを示すことが判明した。これに対して代表的な有機カチオンである ^{14}C -TEA (テトラエチルアンモニ

特平10-265126

ウム)の取り込みは認められなかった。

【0043】

r k l 4 1 1の有機アニオン輸送のミカエリス-メンテン動力学試験をおこなった。種々の濃度のPAH、エストロンサルフェート、オクラトキシンAのr k l 4 1 1による取り込み量の変化を調べることににより、これらの基質のr k l 4 1 1による輸送の濃度依存性を検討した。放射能標識されたPAH、エストロンサルフェート、オクラトキシンAの取り込み実験は、r k l 4 1 1 cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記記載の方法に準じて実施した。この結果(図2参照)、PAH、エストロンサルフェート、オクラトキシンAの K_m 値はそれぞれ4.7 μ M、2.3 μ Mおよび0.74 μ Mであった。結果を次の表1に示す。

【0044】

【表1】

	K_m (μ M)	V_{max} (pmol/hr/oocyte)	V_{max}/K_m (μ l/hr/oocyte)
PAH	64.7 \pm 10.0	23.3 \pm 2.8	0.360
エストロンサルフェート	2.34 \pm 0.20	7.60 \pm 0.44	3.24
オクラトキシンA	0.739 \pm 0.178	3.08 \pm 0.33	4.17

【0045】

(2) r k l 4 1 1の基質選択性をさらに検討するために、r k l 4 1 1 cRNAを注入した卵母細胞による 3 H-エストロンサルフェートの取り込み実験系において、系へ各種アニオン性物質を添加し、その影響を調べた(阻害実験)。

3 H-エストロンサルフェートの取り込み実験は、r k l 4 1 1 cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記記載方法に準じて実施した。1 mMの各種化合物(非標識)の存在下および非存在下で、 3 H-エストロンサルフェートの取り込みを測定した。その結果、種々のアニオン性物質(タウロコール酸、コール酸、プロモサルフォフタレイン、プロベネシド、インドシアニングリーン、ブメタニド、セフォペラゾン、ピロキシカム、フロセミド、アジドチミジン、ベンジルペニシリンなど)はr k l 4 1 1による 3 H-エストロンサルフェートの輸送を有意

に阻害した（図3参照）。一方、テトラエチルアンモニウム、グアニジン、キニジン、ベラバミルのようなカチオン性物質は阻害作用を示さなかった（図3参照）。以上の結果から、rk1411は多選択性トランスポーターであり、又、主に有機アニオンを認識することから、rk1411をOATファミリーの第三のメンバーとして、OAT3（organic anion transporter 3）と命名した。

【0046】

実施例3

ラットの各組織におけるOAT3遺伝子の発現（ノーザンブロッティング）の解析を行った。OAT3 cDNAの全長を ^{32}P -dCTPでラベルし、これをプローブとして用いてラットの種々の組織から抽出したRNAに対してノーザンブロッティングを以下のように行った。3 μg のポリ（A）+RNAを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動した後にニトロセルロースフィルターにトランスファーした。このフィルターを42℃で、 ^{32}P -dCTPでラベルしたOAT3 cDNA全長を含んだハイブリダイゼーション液で一晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを65℃にて、0.1%SDSを含む0.1xSSCで洗浄した。

ノーザンブロットの結果（図4参照）、腎臓、肝臓、脳において、2.4Kb付近に強いバンドが検出された。また目に弱い発現が観察された。

【0047】

実施例4

OAT3がOATファミリーのメンバーの中では最も強く脳に発現していたため、その脳での役割を推測する試みとして、神経伝達物質の種々の代謝物（主に有機アニオン）によるOAT3の輸送阻害実験を行った。図5に示すように、ノルアドレナリンやセロトニン代謝物はOAT3によるエストロンサルフェート輸送を阻害し、それら自身がOAT3の基質となる可能性を示した。この事実は、OAT3の脳型での役割のひとつとして神経伝達物質の代謝物の脳外排出作用を示唆するものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Brain type organic anion transporter and its gene encoded

<130> PA907368

<160> 2

<210> 1

<211> 2191

<212> DNA

<213> Rat

<400> 1

ctgagctgtc ctaccacagc agccgcccga ccctaggaca gagcacgggc caccgcccga	60
tccacctcca gtccaactgg atccagctcc aaccaccagt ttgtgttcac ctgtccctgg	120
gccatgacct tctccgagat tctggaccgt gtcggaagca tgggccccct ccagtacctg	180
catgtgacct tgcctggccc cccagtcctc ggaatagcca accacaactt gctacagatc	240
ttcacagcca ccacccctgt ccaccactgt cgcccgcccc ccaacgcctc tataggggccc	300
tgggtactcc ccttggaccc aaatgggaag cctgagaagt gtctccgctt cgtacatctg	360
ccaaatgcca gtcttcccaa tgacaccagc agggccaccg agccgtgctt ggatggctgg	420
atctacaaca gcaccagaga caccattgtg atagagtggg acttgggtgt cagctccaac	480
aaactgaagg agatggccca gtcgatcttc atggcaggca tactggttgg aggacctgtg	540
attggagaac tgcagacag gtttggccgc aagcctatcc tgacctggag ttatctcatg	600
ctggcagcca gcggctctgg tgctgccttc agtcccagcc tccctgtcta tatgatcttc	660
cgattcctgt gtggctgcag catctcgggc atttctctga gcaccgttat ctggaatgtg	720
gaatgggtac ccacctgat gcggggccatc tcatcaacat ctattgggta ctgctacacc	780
attggtcagt tcattctgtc cggcctggcc tatgccattc ctgagtggcg ctggctacag	840
ttaacctcgt ctgctccctt ctcatcttc tccttgttgt cctgggtgggt accagagtcc	900

atacgtggc iggttctatc tggaaaatac tcaaaggccc tgaagacact ccaacgggtg	960
gctaccttca acggcaagaa ggaggaaggg aaaaagctca ccatagagga gctgaagttc	1020
aacttgcaga aggacatcac ctacagccaag gtcaaatacg gcttatctga cttgttccgg	1080
gtgtccatcc ttctgtctgt gaccttctgt ctctctctgg cctggttttc tactggtttt	1140
gcctactaca gtttggctat gggggtagaa gaatttggag tcaacatcta catactccag	1200
attatctttg gtgggggtga catccagcc aagttcatca caatcctctc cttaagttat	1260
ctgggccggc gcatcactca gagcttcctc ctgctcctag caggaggggc cattttggcc	1320
ctcatctttg tgccttcaga aatgcagctc ttgagaacag cactggctgt gtttggaaag	1380
ggatgcctat ctggctcctt cagctgcctc ttctcttaca cgagttagct ctaccctaca	1440
gtcctcaggc aaacaggtat gggatcagc aacgtgtggg ctgagtagg aagtatgata	1500
gccccactgg tgaaaatcac gggatgaactg cagcccttca tccctaattgt catctttggg	1560
accacggccc tactgggagg cagtgtgcc ttctttctgc ttgagaccct caatcgcccc	1620
ttaccggaga ctatcgagga catacaaaac tggcacaagc aagtcagaa aacaaagcag	1680
gagtcggaag cagaaaaggc atcccaaata atcccgtga agactgggtg ataggaccct	1740
agctgagaac aacagaatcc tctttcttgg ccacaagaga ctgatcccaa gcagtaccct	1800
tctggagttc cttgggcacc ttgggggttg gggaaagccc taggtgggcc catgctcttg	1860
gaacaaaaac ttctgagagt tcagtaaagg tgttctaccc tcatcacctc caccatagcc	1920
tacaaccag acccggcctg ctacacagctc tagccatagg ctcccatac tctgcactc	1980
atcctccctg cagcccagcc ctgccattct tctgtcaacc ctigccatat tggccatttc	2040
ctccattgtc ccacctccat ttctcttgag atcccctagc agttctaag gtttcttctt	2100
accttgcca aactctctcc ttggtgggaa atttcaataa accacaatga agaactcaaa	2160
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	2191

<210> 2

<211> 536

<212> PRT

<213> Rat

<400> 2

Met Thr Phe Ser Glu Ile Leu Asp Arg Val Gly Ser Met Gly Pro

15

特平 1 0 — 2 6 5 1 2 6

Phe Gln Tyr Leu His Val Thr Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Gly	30
Ile Ala Asn His Asn Leu Leu Gln Ile Phe Thr Ala Thr Thr Pro	45
Val His His Cys Arg Pro Pro Pro Asn Ala Ser Ile Gly Pro Trp	60
Val Leu Pro Leu Asp Pro Asn Gly Lys Pro Glu Lys Cys Leu Arg	75
Phe Val His Leu Pro Asn Ala Ser Leu Pro Asn Asp Thr Gln Arg	90
Ala Thr Glu Pro Cys Leu Asp Gly Trp Ile Tyr Asn Ser Thr Arg	105
Asp Thr Ile Val Ile Glu Trp Asp Leu Val Cys Ser Ser Asn Lys	120
Leu Lys Glu Met Ala Gln Ser Ile Phe Met Ala Gly Ile Leu Val	135
Gly Gly Pro Val Ile Gly Glu Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys	150
Pro Ile Leu Thr Trp Ser Tyr Leu Met Leu Ala Ala Ser Gly Ser	165
Gly Ala Ala Phe Ser Pro Ser Leu Pro Val Tyr Met Ile Phe Arg	180
Phe Leu Cys Gly Cys Ser Ile Ser Gly Ile Ser Leu Ser Thr Val	195
Ile Leu Asn Val Glu Trp Val Pro Thr Ser Met Arg Ala Ile Ser	210
Ser Thr Ser Ile Gly Tyr Cys Tyr Thr Ile Gly Gln Phe Ile Leu	225
Ser Gly Leu Ala Tyr Ala Ile Pro Gln Trp Arg Trp Leu Gln Leu	240
Thr Ser Ser Ala Pro Phe Phe Ile Phe Ser Leu Leu Ser Trp Trp	255
Val Pro Glu Ser Ile Arg Trp Leu Val Leu Ser Gly Lys Tyr Ser	270
Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gln Arg Val Ala Thr Phe Asn Gly Lys	285
Lys Glu Glu Gly Lys Lys Leu Thr Ile Glu Glu Leu Lys Phe Asn	300
Leu Gln Lys Asp Ile Thr Ser Ala Lys Val Lys Tyr Gly Leu Ser	315
Asp Leu Phe Arg Val Ser Ile Leu Arg Arg Val Thr Phe Cys Leu	330
Ser Leu Ala Trp Phe Ser Thr Gly Phe Ala Tyr Tyr Ser Leu Ala	345
Met Gly Val Glu Glu Phe Gly Val Asn Ile Tyr Ile Leu Gln Ile	360
<hr/>	
Ile Phe Gly Gly Val Asp Ile Pro Ala Lys Phe Ile Thr Ile Leu	375
Ser Leu Ser Tyr Leu Gly Arg Arg Ile Thr Gln Ser Phe Leu Leu	390
Leu Leu Ala Gly Gly Ala Ile Leu Ala Leu Ile Phe Val Pro Ser	405
Glu Met Gln Leu Leu Arg Thr Ala Leu Ala Val Phe Gly Lys Gly	420
Cys Leu Ser Gly Ser Phe Ser Cys Leu Phe Leu Tyr Thr Ser Glu	435
Leu Tyr Pro Thr Val Leu Arg Gln Thr Gly Met Gly Ile Ser Asn	450

Val Trp Ala Arg Val Gly Ser Met Ile Ala Pro Leu Val Lys Ile	465
Thr Gly Glu Leu Gln Pro Phe Ile Pro Asn Val Ile Phe Gly Thr	480
Thr Ala Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Phe Phe Leu Leu Glu Thr	495
Leu Asn Arg Pro Leu Pro Glu Thr Ile Glu Asp Ile Gln Asn Trp	510
His Lys Gln Val Gln Lys Thr Lys Gln Glu Ser Glu Ala Glu Lys	525
Ala Ser Gln Ile Ile Pro Leu Lys Thr Gly Gly	536

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のOAT3をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた時の、有機アニオン取り込み活性を示すものである。

【図2】

図2は、本発明のOAT3の卵母細胞を用いた、PAH、エストロンサルフェート及びオクラトキシンAの輸送の動力学試験の結果を示すものである。

【図3】

図3は、本発明のOAT3の有機アニオン輸送における、各種有機物質の阻害作用の試験の結果を示すものである。

【図4】

図4は、本発明のOAT3遺伝子のノーザンブロッティング解析の結果を示す図面に代わる写真である。

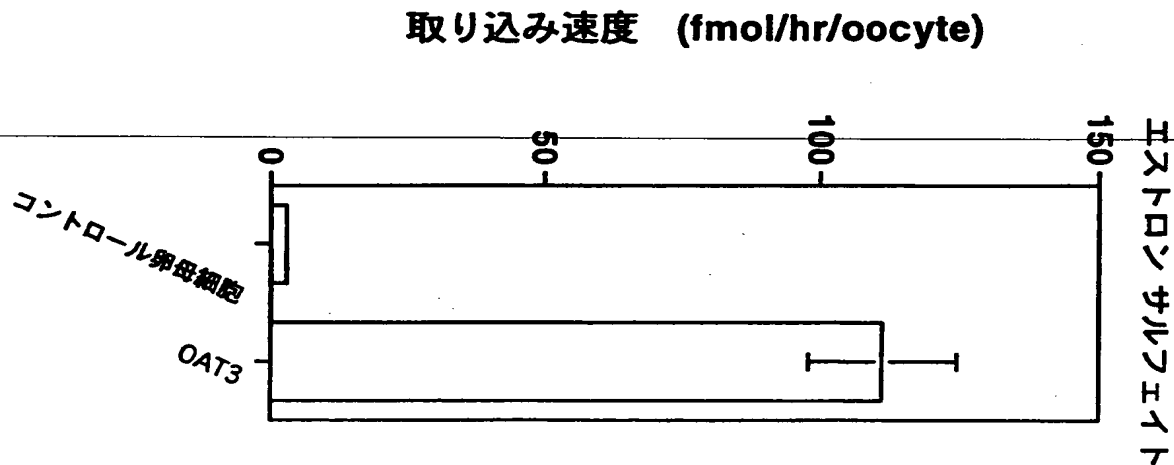
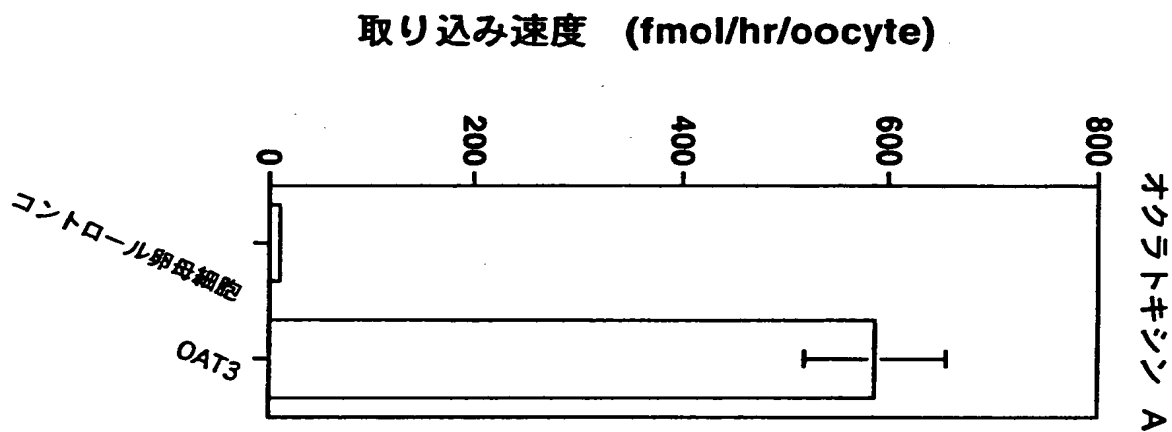
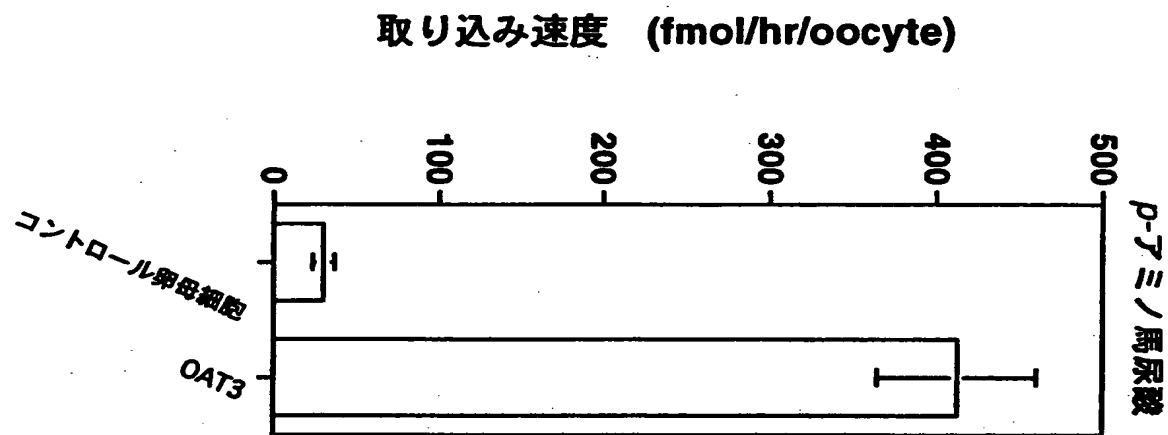
【図5】

図5は、脳型神経伝達物質の種々の代謝物による、OAT3の輸送阻害試験の結果を示すものである。

特平 10 - 265126

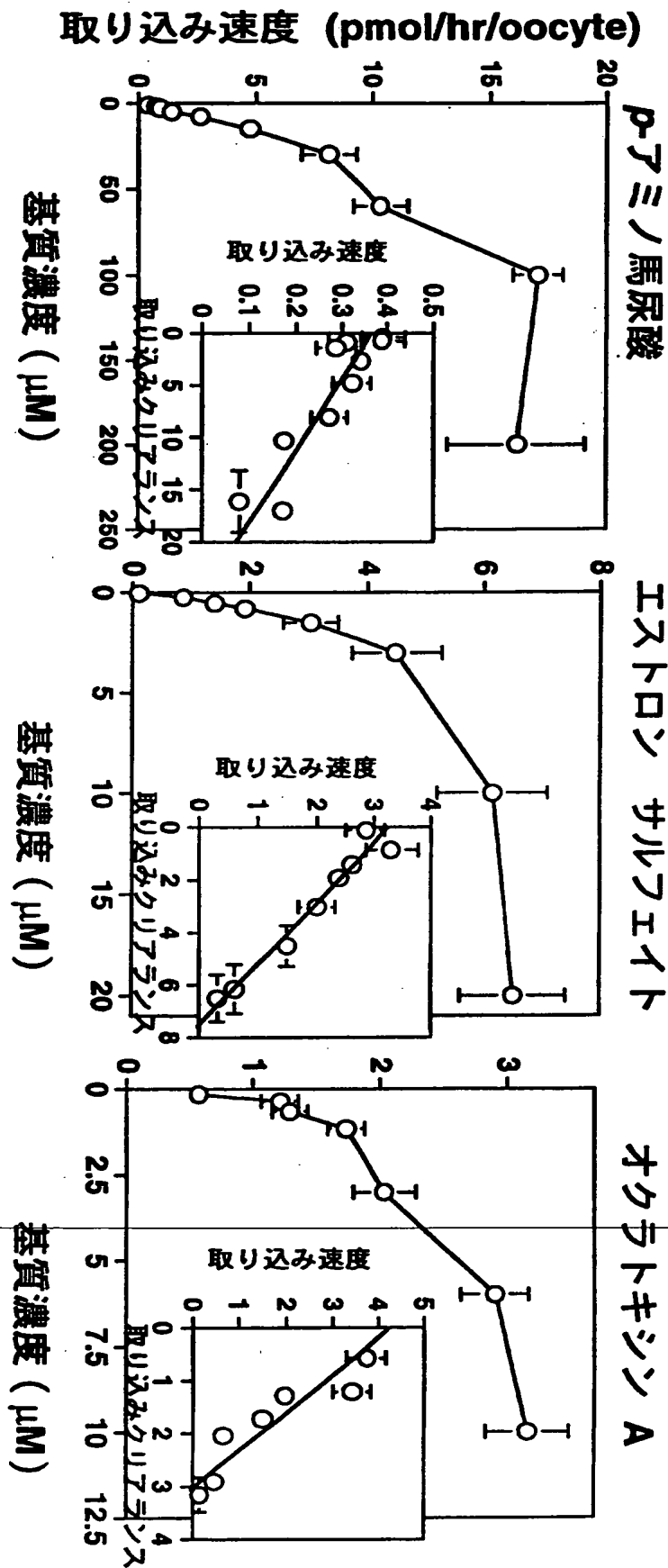
【書類名】 図面

【図 1】

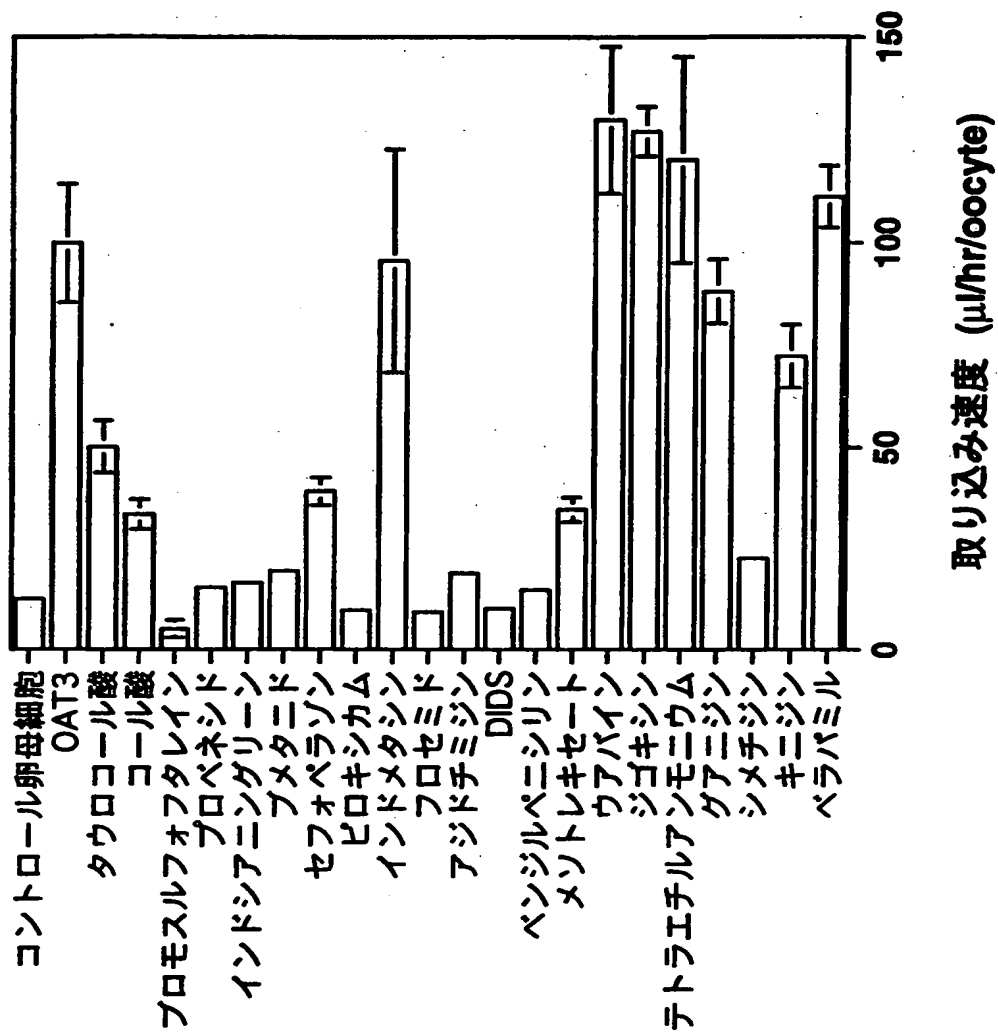


特平 1 0 — 2 6 5 1 2 6

【図 2】



【図 3】



【図 4】

4.40

2.37

1.35

心臓

肺

腎

胆

肝臓

腎臓

空腸

回腸

大腸

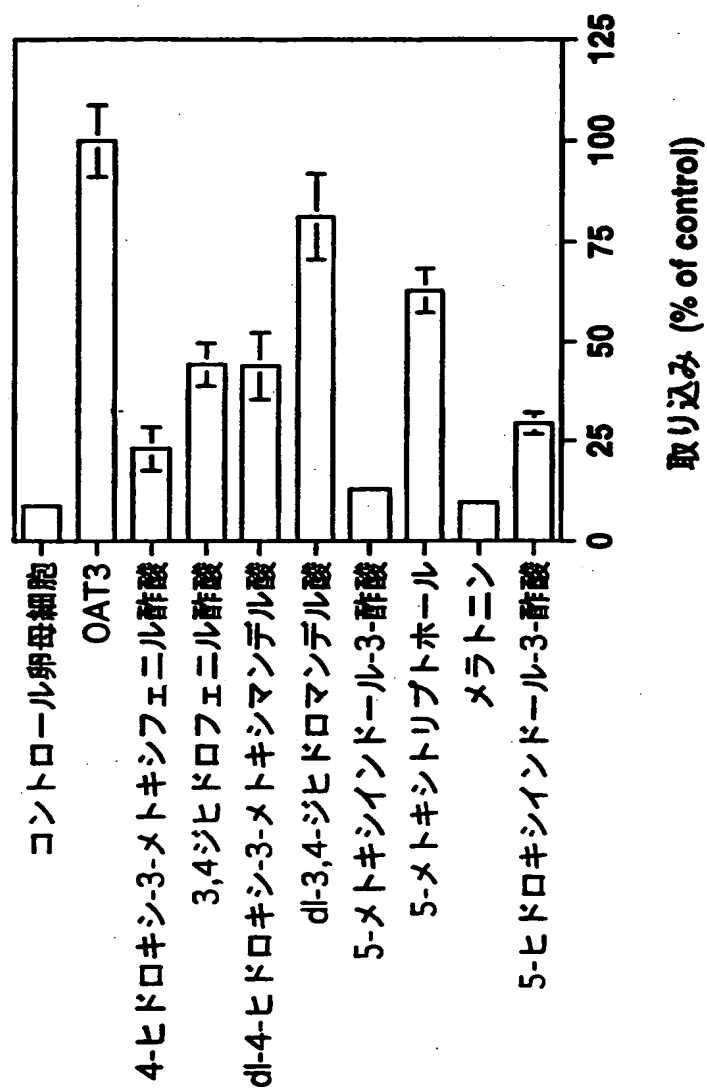
精巣

脾臓

筋

特平 10-265126

【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、脳における有機アニオン性物質の取り込み排出の制御をする蛋白質として有用な脳型有機アニオントランスポーターOAT3、それをコードする塩基配列を有する核酸、及び、それに対する抗体を提供する。

【解決手段】 本発明は、脳型有機アニオントランスポーターOAT3、それをコードする塩基配列、及び、それに対する抗体に関する。本発明の脳型有機アニオントランスポーターOAT2のアミノ酸配列及び塩基配列は、明細書中の配列表に示されている。

【選択図】 なし

特平 10-265126

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102668

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9

階 たくみ特許事務所

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

特平10-265126

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.